(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2008-307205
(P2008-307205A)
(43)公開日　平成20年12月25日(2008.12.25)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61L 27/00	(2006.01)	A61L	27/00	E	2G045
C12N 5/06	(2006.01)	C12N	5/00	ZNAE	4B024
C12Q 1/02	(2006.01)	C12Q	1/02		4B063
G01N 33/15	(2006.01)	G01N	33/15	Z	4B065
G01N 33/50	(2006.01)	G01N	33/50	Z	4C081

審査請求 未請求　請求項の数 12　ＯＬ　（全 31 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-157389 (P2007-157389)
(22)出願日　平成19年6月14日 (2007.6.14)

(71)出願人　504176911
国立大学法人大阪大学
大阪府吹田市山田丘１番１号
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100116311
弁理士　元山　忠行
(74)代理人　100122301
弁理士　冨田　憲史
(72)発明者　澤　芳樹
大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】心筋芽細胞を含むシート

(57)【要約】　（修正有）
【課題】心筋芽細胞を大量に得る方法、ならびに心筋芽細胞を含むシートを提供する。さらに、心筋芽細胞への分化を促進する物質をスクリーニングする方法を提供する。
【解決手段】脂肪組織由来幹細胞を、ＤＭＳＯまたはＯＰ９培養上清の存在下培養して、心筋芽細胞に分化させ、次に心筋芽細胞を含むシートを形成させる方法。さらに、心筋芽細胞への分化を促進する候補物質を、脂肪組織由来幹細胞培養時に添加して、該分化促進物質をスクリーニングする方法。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
心筋芽細胞を含むシート。
【請求項２】
脂肪組織由来幹細胞を培養することを特徴とする、心筋芽細胞を得る方法。
【請求項３】
培養がＤＭＳＯ、またはＯＰ９培養上清の存在下で行われるものである、請求項２記載の方法。
【請求項４】
脂肪組織由来幹細胞がＡＤＭＰＣである、請求項２または３記載の方法。
【請求項５】
請求項２から４のいずれか記載の方法により得ることのできる、心筋芽細胞。
【請求項６】
心筋芽細胞を含むシートを得る方法であって、
下記工程：
（ａ）脂肪組織由来幹細胞を心筋芽細胞に分化させ、次に、
（ｂ）心筋芽細胞を含むシートを形成させる、
を含む、方法。
【請求項７】
脂肪組織由来幹細胞から心筋芽細胞への分化が、ＤＭＳＯ、またはＯＰ９培養上清の存在下で行われるものである、請求項６記載の方法。
【請求項８】
脂肪組織由来幹細胞がＡＤＭＰＣである、請求項６または７記載の方法。
【請求項９】
請求項６から８のいずれか記載の方法により得ることのできる、心筋芽細胞を含むシート。
【請求項１０】
心筋芽細胞への分化を促進する物質をスクリーニングする方法であって、下記工程：
（ａ）脂肪組織由来幹細胞を候補物質を含む培地にて心筋芽細胞に分化させ；
（ｂ）脂肪組織由来幹細胞の心筋芽細胞への分化を調べる、
を含み、該分化が、候補物質不含培地にて脂肪組織由来幹細胞を培養した場合の分化と比較して促進されている場合に、該候補物質が心筋芽細胞への分化を促進する物質であることを示す、方法。
【請求項１１】
請求項１０記載の方法により得ることのできる、心筋芽細胞への分化を促進する物質。
【請求項１２】
請求項１０記載の方法に用いられる、心筋芽細胞への分化を促進する物質をスクリーニングするためのキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、心筋芽細胞を含むシート、脂肪組織由来幹細胞から心筋芽細胞および心筋芽細胞を含むシートを得る方法などに関するものである。
【背景技術】
【０００２】
本邦においても生活の西欧化に伴い、生活習慣病とそれに続発する虚血性心疾患の発症頻度が増加している。近年の治療技術の進歩に伴い、虚血性心疾患の多くが治療可能となってきたが、かかる治療技術を用いても、重症心不全を治療することは難しく、治療法の確立が急務とされている。
【０００３】

重症心不全を治療するにあたり、再生医療的手法が注目されている。これまでに、骨髄由来単核球細胞、骨格筋由来細胞、脂肪組織由来幹細胞、心筋より採取された心筋芽細胞などの単一細胞を、needle injectionにより、あるいは冠動脈経由で心筋に移植する治療法が試みられてきた（非特許文献１）。しかしながら、かかる方法には、移植した細胞の大半が生着しないという問題があった。

【０００４】

近年、脂肪組織由来幹細胞（ＡＤＳＣ）からなる一層の細胞シートを心臓に移植することで、心機能が改善され得ることが報告された（非特許文献２）。しかしながら、移植されたＡＤＳＣは心筋細胞に分化することはできず、心筋の補充には至らなかった。そこで、心筋細胞へ分化方向付けられた心筋芽細胞のシート、およびかかるシートを調製するために心筋芽細胞を大量に得ることが必要であった。

【非特許文献１】Suzuki K et al., Circulation. 2004 Sep 14; 110 (11 Suppl 1): II 225-30

【非特許文献２】Miyahara Y et al., Nat Med. 2006 Apr; 12(4): 459-65

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本発明は、心筋芽細胞を大量に得ること、ならびにかかる心筋芽細胞を含むシートを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

本発明者らは、上記事情に鑑み鋭意研究を重ねた結果、脂肪組織由来幹細胞をＤＭＳＯ、またはＯＰ９培養上清の存在下で培養すると、心筋芽細胞に分化し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【０００７】

すなわち、本発明は、

（１）心筋芽細胞を含むシート、

（２）脂肪組織由来幹細胞を培養することを特徴とする、心筋芽細胞を得る方法、

（３）培養がＤＭＳＯ、またはＯＰ９培養上清の存在下で行われるものである、（２）記載の方法、

（４）脂肪組織由来幹細胞がＡＤＭＰＣである、（２）または（３）記載の方法、

（５）（２）から（４）のいずれか記載の方法により得ることのできる、心筋芽細胞、

（６）心筋芽細胞を含むシートを得る方法であって、

下記工程：

（ａ）脂肪組織由来幹細胞を心筋芽細胞に分化させ、次に、

（ｂ）心筋芽細胞を含むシートを形成させる、

を含む、方法、

（７）脂肪組織由来幹細胞から心筋芽細胞への分化が、ＤＭＳＯ、またはＯＰ９培養上清の存在下で行われるものである、（６）記載の方法、

（８）脂肪組織由来幹細胞がＡＤＭＰＣである、（６）または（７）記載の方法、

（９）（６）から（８）のいずれか記載の方法により得ることのできる、心筋芽細胞を含むシート、

（１０）心筋芽細胞への分化を促進する物質をスクリーニングする方法であって、下記工程：

（ａ）脂肪組織由来幹細胞を候補物質を含む培地にて心筋芽細胞に分化させ；

（ｂ）脂肪組織由来幹細胞の心筋芽細胞への分化を調べる、

を含み、該分化が、候補物質不含培地にて脂肪組織由来幹細胞を培養した場合の分化と比較して促進されている場合に、該候補物質が心筋芽細胞への分化を促進する物質であることを示す、方法、

（１１）（１０）記載の方法により得ることのできる、心筋芽細胞への分化を促進する物

質、および
（１２）（１０）記載の方法に用いられる、心筋芽細胞への分化を促進する物質をスクリーニングするためのキット、
を提供するものである。
【発明の効果】
【０００８】
本発明により、心筋芽細胞を含むシート、脂肪組織由来幹細胞から心筋芽細胞および心筋芽細胞を含むシートを得る方法などが提供される。
【発明を実施するための最良の形態】
【０００９】
本発明により、シートを構成するのに十分な量の心筋芽細胞が提供される。従って、本発明は、１の態様において、心筋芽細胞を含むシートを提供するものである。本明細書において、心筋芽細胞とは、心筋細胞に分化するよう方向付けられた細胞であって、α-cardiac actin（α－ＣＡ）およびMyosin Light Chain（ＭＬＣ）を発現している細胞をいう。心筋芽細胞が由来する動物種は特に限定されず、好ましくは、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。あるいは、かかる心筋芽細胞を含むシートが適用される対象と同種、または同一のものが好ましい。例えば、対象と同種または同一動物由来の心筋芽細胞を含むシートを対象に移植することで、拒絶反応を危惧することなく重症心不全を治療することなどが可能となる。
【００１０】
心筋芽細胞を含むシートとは、心筋芽細胞を必須構成成分として含む細胞塊をいう。シートにおいて、心筋芽細胞は単層または重層のいずれの形態で含まれていてもよい。シート形態を有することにより、移植等に用いる際の取扱が容易になる。シートの心筋芽細胞以外の構成成分は、いずれのものであってもよく、例えば、脂肪組織由来幹細胞、心筋細胞、細胞用のスキャホールド、血管内皮、マトリクスなどが挙げられる。シートの大きさおよび厚さは、適用される傷害領域の大きさなど種々の条件に応じて適宜選択され得る。
【００１１】
シートに含まれる心筋芽細胞の割合は、特に限定されず、例えば、かかるシートが適用される対象の状態など種々の条件に応じて適宜選択され得る。該割合は、例えば、５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、１００％などである。心筋芽細胞の割合は、当業者に既知の手段、例えば、定量的ＲＴ－ＰＣＲを用いて心筋芽細胞マーカー遺伝子であるα－ＣＡまたはＭＬＣを定量することにより、決定され得る。
【００１２】
本発明のシートの機能は、公知の方法、例えば、シートを対象に移植して、移植された対象の心機能を心エコーにより、あるいは拡張末期径（ＬＶＤｄ）、収縮末期径（ＬＶＤｓ）、左室駆出率（％ＥＦ）または左室内径短縮率（％ＦＳ）などを計測することにより評価して、調べることができる。
【００１３】
本発明は、もう１つの態様において、脂肪組織由来幹細胞を培養することを特徴とする、心筋芽細胞を得る方法を提供する。該方法により、脂肪組織由来幹細胞から心筋芽細胞を大量に得ることが可能となる。該方法は、脂肪組織由来細胞から脂肪組織由来幹細胞を得る工程を含むんでいてもよい。脂肪組織由来幹細胞とは、内胚葉、中胚葉、外胚葉などの種々の細胞系列に分化することができる細胞をいい、未分化マーカーであるＩｓｌｅｔ－１を発現している脂肪組織由来多系統前駆細胞（ＡＤＭＰＣ）を含む。脂肪組織由来幹細胞が由来する動物種は特に限定されず、好ましくは、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。あるいは、かかる脂肪組織由来幹細胞から得られた心筋芽細胞を用いて治療されるべき対象と同種または同一のものが好ましい。

【００１４】
好ましくは、本発明の心筋芽細胞を得る方法は、脂肪組織由来幹細胞をＤＭＳＯまたはＯＰ９培養上清の存在下で培養する工程を含むものである。かかる条件下で脂肪組織由来幹細胞を培養することにより、該細胞が心筋芽細胞に分化および／または誘導され得る。かかる培養に用いられる培地は、適宜選択され得る。かかる培地は、例えば、レチノイン酸、ＢＭＰ２、ＢＭＰ４、ＴＧＦβ２、ＨＧＦ、ｂＦＧＦ、チロキシン、オキシトシンまたは脂肪酸濃縮液などの種々の因子を含むものであってもよい。心筋芽細胞への分化は、例えば、α－ＣＡまたはＭＬＣなどの心筋芽細胞マーカーの発現をＲＴ－ＰＣＲによって測定することにより、調べることができる。
【００１５】
従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞を得る方法により得ることのできる心筋芽細胞を提供するものである。かかる心筋芽細胞を心筋梗塞、心筋症などの心疾患の治療に用いることもできるし、あるいは心筋芽細胞を含むシートの材料として用いることもできる。
【００１６】
本発明は、別の態様において、心筋芽細胞を含むシートを得る方法であって、下記工程：（ａ）脂肪組織由来幹細胞を心筋芽細胞に分化させ、次に、（ｂ）心筋芽細胞を含むシートを形成させる、を含む方法を提供するものである。これらの工程は、連続して行われてもよいし、あるいは並行して行われてもよい。かかる方法により、心筋芽細胞を含むシートを容易かつ効率的に得ることができる。脂肪組織由来幹細胞を心筋芽細胞に分化させる工程は、上述の通りである。
【００１７】
心筋芽細胞から心筋芽細胞を含むシートを形成させる工程は、当業者に既知の手段または方法により達成され得る。好ましくは、該工程は、心筋芽細胞を付着した状態で増殖させて細胞塊を形成させ、次に、形成された細胞塊を剥離することにより達成され得る。用いられる心筋芽細胞の数、および培養時間は、得られるシートの大きさ、シートに含まれる心筋芽細胞の数など種々の条件に応じて適宜選択され得る。例えば、心筋芽細胞10^5～10^6個を２４～７２時間培養することにより、シートを得てもよい。細胞塊の剥離は、種々の手段、例えば、物理的刺激により行われ得る。あるいは、心筋芽細胞を温度感受性培養皿にて培養し、例えば、２０℃以下にてインキュベーションすることにより、細胞塊を剥離してもよい。
【００１８】
従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞を含むシートを得る方法により得ることのできる、心筋芽細胞を含むシートに関するものである。かかる心筋芽細胞を含むシートを、心筋梗塞、心筋症などの心疾患の治療に用いることができる。
【００１９】
本発明は、別の態様において、心筋芽細胞を含むシートまたは心筋芽細胞を対象に移植することを特徴とする、心筋の機能低下により生じる疾患を治療および／または予防する方法に関するものである。心筋の機能低下により生じる疾患とは、例えば、急性心筋梗塞、陳旧性心筋梗塞、虚血性心筋梗塞、拡張型心筋症、先天性心疾患などである。対象への移植は、当業者に既知の方法により行われ得る。例えば、心筋芽細胞を含むシートを、心筋の機能が低下した領域に移植することにより、あるいは心筋芽細胞を冠動脈経由で移植することにより、行われ得る。移植するシートの大きさおよび厚さ、シートに含まれる心筋芽細胞の数、および心筋芽細胞数は、対象の状態、傷害領域の大きさなど種々の条件に応じて適宜選択され得る。
【００２０】
従って、本発明は、さらなる態様において、心機能の低下により生じる疾患を治療および／または予防するための、心筋芽細胞を含むシートまたは心筋芽細胞を含む組成物を提供するものである。かかる組成物は、該シートまたは心筋芽細胞以外に、例えば、ＰＢＳ、培地、生着を促進させる物質、心機能改善薬、成長因子、増殖因子などを含んでいても

よい。

【００２１】

本発明は、別の態様において、心筋芽細胞への分化を促進する物質をスクリーニングする方法であって、下記工程：

（ａ）脂肪組織由来幹細胞を候補物質を含む培地にて心筋芽細胞に分化させ；

（ｂ）脂肪組織由来幹細胞の心筋芽細胞への分化を調べる、

を含み、該分化が、候補物質不含培地にて脂肪組織由来幹細胞を培養した場合の分化と比較して促進されている場合に、該候補物質が心筋芽細胞への分化を促進する物質であることを示す方法に関するものである。候補物質としては種々のものがあり、例えば、レチノイン酸、ＢＭＰ２、ＢＭＰ４、ＴＧＦβ２、ＨＧＦ、ｂＦＧＦ、チロキシン、またはオキシトンのアナログおよび誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。脂肪組織由来幹細胞の心筋芽細胞への分化は上述の通りである。心筋芽細胞への分化は、種々の方法、例えば、α－ＣＡまたはＭＬＣなどの心筋芽細胞マーカーの発現をＲＴ－ＰＣＲによって測定することにより、調べることができる。

【００２２】

従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞への分化を促進する物質のスクリーニング方法により得ることのできる、心筋芽細胞への分化を促進する物質に関するものである。該物質を、上述の心筋芽細胞および心筋芽細胞を含むシートの製造方法に用いて、得られる心筋芽細胞およびシートの数を増大させてもよい。または、かかる物質を心機能の低下により生じる疾患の治療または予防に用いてもよい。

【００２３】

本発明は、別の態様において、心筋芽細胞への分化を抑制する物質をスクリーニングする方法であって、下記工程：

（ａ）脂肪組織由来幹細胞を候補物質を含む培地にて心筋芽細胞に分化させ；

（ｂ）脂肪組織由来幹細胞の心筋芽細胞への分化を調べる、

を含み、該分化が、候補物質不含培地にて脂肪組織由来幹細胞を培養した場合の分化と比較して抑制されている場合に、該候補物質が心筋芽細胞への分化を抑制する物質であることを示す、方法に関するものである。候補物質としては種々のものがあり、例えば、ノギンのアナログおよび誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００２４】

従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞への分化を抑制する物質のスクリーニング方法により得ることのできる、心筋芽細胞への分化を抑制する物質に関するものである。該物質を心機能の上昇により生じる疾患の治療または予防に用いてもよい。

【００２５】

さらに、本発明は、心筋芽細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキットに関するものである。本発明のキットは、脂肪組織由来幹細胞、培地、培養容器、ならびに心筋芽細胞への分化を調べる手段等を含んでいてもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。かかるキットを用いて、上記スクリーニングを迅速かつ容易に行うことができる。

【００２６】

本発明は、別の態様において、心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法であって、下記工程：

（ａ）脂肪組織由来幹細胞を候補物質を含む培地にて心筋芽細胞に分化させ；または

（ｂ）候補物質存在下にて心筋芽細胞を含むシートを形成させ；

（ｃ）心筋芽細胞を含むシートの形成を調べる、

を含む、該形成が、候補物質不含系にて形成させたものと比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質であることを示す方法に関するものである。シートの形成を調べる方法は、上述の通りである。候補物質の添加は、上記工程（ａ）および（ｂ）の両方において行われてもよいし、一

方にて行われてもよい。

【００２７】

従って、本発明は、さらなる態様において、上記心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質のスクリーニング方法により得ることのできる、心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質に関するものである。

【００２８】

さらに、本発明は、上記心筋芽細胞を含むシートの形成を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキットに関するものである。

【００２９】

本発明は、１の態様において、脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む細胞集団に関するものである。脂肪組織由来多系統前駆細胞は、内胚葉、中胚葉、外胚葉などの種々の細胞系列に分化することができる細胞であって、未分化マーカーであるＩｓｌｅｔ－１を発現する細胞をいう。脂肪組織由来多系統前駆細胞は、脂肪組織の他、胚性幹細胞などから分化させて得ることができる。脂肪組織由来多系統前駆細胞が由来する動物種は特に限定されず、好ましくは、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。あるいは、かかる細胞集団を用いた再生医療により治療されるべき対象と同種または同一のものが好ましい。

【００３０】

本発明の細胞集団は、非所望な夾雑物、例えば、赤血球、血管内皮細胞などの脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞の割合が低いので、培養の容易さ、高い分化効率などの利点を有する。かかる夾雑物を除去する手段としては、脂肪組織由来多系統前駆細胞の比重との差を利用した手段・方法、例えば、比重法、脂肪組織由来多系統前駆細胞の付着性との差を利用した手段・方法、例えば、ＥＤＴＡのようなキレート剤、トリプシンのような酵素を用いた方法、ソーティング、ＭＡＣＳなどの抗原抗体法、形態的に選別する方法、単一細胞クローン化、溶血法などが挙げられる。細胞集団における夾雑物の低減は、例えば、夾雑物が有するマーカーをＲＴ－ＰＣＲ、ＥＬＩＳＡなどの方法を用いて定量することにより、顕微鏡下で視覚的に、あるいはフローサイトメトリー、免疫組織染色により確認され得る。

【００３１】

本発明の細胞集団は、好ましくは、少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９３％、９６％、または９９％の脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む。脂肪組織由来多系統前駆細胞がかかる割合含まれることにより、本発明の細胞集団は、脂肪組織由来多系統前駆細胞の維持が容易であること、分化させたときの効率が高いことなどの利点を有する。本発明の細胞集団は、脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の他、フィーダー細胞のような脂肪組織由来多系統前駆細胞の維持または分化に有効な細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞などを含んでいてもよい。かかる細胞を含むことにより、上記利点が増強され得る。

【００３２】

本発明は、別の態様において、脂肪組織から脂肪組織由来多系統前駆細胞を得る方法であって、（ａ）脂肪組織由来細胞集団から赤血球を除去し、前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団を得て；次に、（ｂ）該前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団から脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞を除去し、脂肪組織由来多系統前駆細胞を得る、工程を含む方法に関するものである。本発明により、脂肪組織由来の脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞を低減させ、脂肪組織由来多系統前駆細胞を高収率かつ高純度で得ることができる。本発明において、上記工程は、連続して行われてもよいし、あるいは並行して行われてもよい。本発明のこの態様に用いられる脂肪組織は、生体内の皮下脂肪組織および内臓脂肪組織のいずれであってもよい。脂肪組織が由来する動物種は特に限定されず、好ましくは、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。あるいは、本発明の方法により得ることのできる脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いた再生医療により治療されるべき対象と同種または同一の

ものが好ましい。

【００３３】

本明細書において用いられる脂肪組織由来細胞集団は、少なくとも脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む細胞集団をいう。脂肪組織由来細胞集団は、脂肪組織由来多系統前駆細胞の他に、赤血球、血管内皮細胞、線維芽細胞などを含んでいてもよい。脂肪組織由来細胞集団は、例えば、脂肪組織をコラゲナーゼなどの酵素により、あるいは物理的手段・方法により処理し、および／または脂質などを例えば、遠心分離、フィルター処理により除去して得られる。

【００３４】

赤血球は脂肪組織由来多系統前駆細胞を吸着する性質を有し、これにより、脂肪組織由来多系統前駆細胞の収率を低下させ得る。従って、脂肪組織由来細胞集団から赤血球を除去することが必要になる。脂肪組織由来細胞集団からの赤血球の除去は、いずれの手段・方法により行われてもよく、例えば、赤血球とそれ以外の細胞の付着性の差に基づくもの以外の手段・方法で行われるものであってもよい。好ましくは、かかる除去は、比重法、溶血法、フィルター法により、より好ましくは、比重法により行われる。比重法は、適当な比重の比重液、例えば、Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐなどの市販の比重液を用いて行われ得る。用いられる比重液の比重は、赤血球とそれ以外の細胞の比重の間のものであればよく、好ましくは、１．０６３～１．１１９、より好ましくは、１．０７０～１．１１０、最も好ましくは、１．０７７である。

【００３５】

本明細書において用いられる前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団は、少なくとも脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む細胞集団をいう。前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団は、脂肪組織由来多系統前駆細胞の他に、血管内皮細胞、線維芽細胞などを含んでいてもよい。上述の通り、前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団は、実質上、赤血球を含まない。赤血球を除去して、前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団を形成させることで、続く脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞の除去が容易かつ効率よく行われ得る。

【００３６】

本明細書において用いられる脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞は、血管内皮細胞、線維芽細胞などの付着細胞などをいう。前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団からの脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞の除去は、いずれの手段・方法により行われてもよいが、好ましくは、トリプシン以外の物質、より好ましくは、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡなどのキレート剤、最も好ましくは、ＥＤＴＡを用いて行われる。好ましくは、かかる除去は、脂肪組織由来多系統前駆細胞とそれ以外の細胞との付着性の差に基づき、行われるものである。上記の他、例えば、フィルター濾過などにより、脂肪組織由来多系統前駆細胞以外の細胞を除去することができる。これらの細胞を除去することで、得られる脂肪組織由来多系統前駆細胞集団の純度、および収率が上昇する。

【００３７】

本発明は、別の態様において、上記脂肪組織から脂肪組織由来多系統前駆細胞を得る方法により得ることのできる脂肪組織由来多系統前駆細胞に関するものである。かかる脂肪組織由来多系統前駆細胞は、上述の通りＩｓｌｅｔ－１を発現する。

【００３８】

本発明は、さらなる態様において、上記脂肪組織から脂肪組織由来多系統前駆細胞を得る方法により得ることのできる脂肪組織由来多系統前駆細胞を含む細胞集団に関するものである。かかる細胞集団は、赤血球、血管内皮細胞などの不所望な脂肪組織由来の細胞を実質上含まないが、フィーダー細胞などの脂肪組織由来多系統前駆細胞の維持・分化などに有効な細胞を含んでいてもよい。

【００３９】

本発明は、１の態様において、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法に関するものである。本発明は、肝臓の最小機能単位である肝小葉に類似する細胞塊を形成できる点で非常に優れている。脂肪組織由来

細胞とは、内臓脂肪組織または皮下脂肪組織から得られる細胞または細胞集団、あるいは間葉系肝細胞、ＥＳ細胞の様な幹細胞から分化誘導された生体内の脂肪組織に含まれる細胞に類似した細胞または細胞集団をいう。通常には、脂肪組織由来細胞とは、脂肪組織由来幹細胞、脂肪組織由来間質細胞、上述の脂肪組織由来多系統前駆細胞、脂肪前駆細胞またはこれらに類似する細胞のいずれか、あるいはこれら全てまたは一部からなる混合物を含む細胞集団をいう。脂肪組織由来細胞は、当業者に公知の手段・方法により脂肪組織などから得ることができる。さらに、得られた脂肪組織由来細胞を、当業者に公知の手段・方法を用いて増殖させ、例えば、形質を安定させてもよい。脂肪組織由来細胞を、デキサメサゾンおよびアスコルビン酸を含む培地、例えば、ＩＴＳ（１０．０ｍｇ／Ｌ　インスリン、５．５ｍｇ／Ｌ　トランスフェリン、６．７ｎｇ　亜セレン酸ナトリウム）、１ｎＭ　デキサメサゾン、０．１ｍＭ　アスコルビン酸、１０ｎｇ／ｍＬ　ｒｈＥＧＦ、および５％　ＦＣＳを添加した６０％　ＤＭＥＭ（低グルコース）および４０％　ＭＣＤＢ２０１培地中、フィブロネクチンコートディッシュなどの培養器にて培養することにより、脂肪組織由来細胞を増殖させてもよい。

【００４０】

脂肪組織由来細胞が由来する動物種は、特に限定されず、好ましくは、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。得られた肝小葉様細胞塊を用いて疾患を予防または治療すべき動物種と同一の動物種、あるいは同一個体の脂肪組織由来細胞を用いることがより好ましい。脂肪組織は生体内に十分量存在し、比較的容易に得られるため、例えば、死体などの限られた材料から肝小葉を得る方法などと比較して、本発明は非常に優れている。例えば、自己由来の脂肪組織由来細胞を用いて本発明の上記方法を行い、得られた肝小葉様細胞塊を自己移植することで、拒絶反応を危惧することなく肝硬変などの肝機能の低下により生じる疾患を治療することが可能になる。

【００４１】

肝小葉様細胞塊とは、生体内の肝小葉、およびそれに類似する機能・形態を有する細胞塊をいい、例えば、肝細胞、胆管上皮細胞、内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞などを含む。本発明の肝小葉様細胞塊は、個々の肝細胞と比べ、十分な量の分泌タンパク質を産生できる点、高い代謝能を有する点、高い解毒能を有する点などで非常に優れている。また、細胞塊を形成させることで、例えば、移植等の目的に用い易いという利点も有する。

【００４２】

本発明の、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊の取得方法は、重要な工程として、未分化細胞から肝小葉様細胞塊を形成させる工程を含むことが好ましい。本発明の、脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊の取得方法は、重要な工程として、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程をさらに含むことが好ましい。これらの工程は、連続して行われてもよいし、あるいは並行して行われてもよい。

【００４３】

未分化細胞とは、多種多様な細胞、例えば、肝前駆細胞、膵前駆細胞、心筋前駆細胞、血管内皮前駆細胞、骨芽細胞、軟骨芽細胞などに分化することのできる細胞をいう。未分化細胞を得る工程は、得られた未分化細胞を増殖させる工程をさらに含んでいてもよい。未分化細胞を増殖させることで、肝小葉様細胞塊の形成効率を増大させ、得られる肝小葉様細胞塊の数を増加させることなどが可能である。未分化細胞を得る工程は、例えば、ソーティング、ＭＡＣＳ、ロゼッタ形成法などの抗原抗体反応による方法、密度勾配法、形態的に選別する方法、単一細胞クローン化などの既知の方法を用いて行われてもよいし、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させることにより行われてもよい。すでに分化した細胞を死滅させ、かつ未分化細胞を生存・増殖させることが可能であるため、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させることが好ましい。浮遊化状態での培養については、後述する。ここで、アディポスフェアとは、未分化細胞を主成分として含む球状体であると定義する。アディポスフェアの形成と次の肝小葉様細胞塊への分化は、連続してまたは同時に生じ得るので、

アディポスフェアは未分化細胞の他に肝細胞、胆管上皮細胞、内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞などを含んでいてもよい。

【００４４】

肝小葉様細胞塊を得る工程は、未分化細胞を例えば、線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、オンコスタチンＭ、上皮増殖因子、およびジメチルスルホキシドを含む培地にて培養することにより行われ、好ましくは、かかる工程は、未分化細胞を浮遊化させた状態で培養することにより行われる。浮遊化させて培養することで、生体内の肝小葉に類似した形態を有する細胞塊をより容易に得ることができる。未分化細胞の浮遊化状態での培養は、培養容器との接着を防止あるいは抑制して遊離した状態に細胞を置いて、培養することを意味する。細胞の浮遊化は種々の公知の手段・方法で行うことができる。例えば、細胞の接着を防止あるいは抑制するように処理された、あるいは細胞の接着を防止あるいは抑制するような材料で作られた培養容器または装置を用いて細胞を浮遊化状態においてもよい。培養容器または装置としては、シリコン処理された培養容器（例えば、シリコン化フラスコ）または低接着性培養ディッシュ（例えば、ハイドロセル（CellSeed））のごとき低接着性培養容器などがある。あるいはハンギング・ドロップ培養法を用いて細胞を浮遊化させた状態で培養させてもよい。また、浮遊化の開始時点において、あるいは浮遊化を継続させるために、適宜、公知の手段・方法を併用してもよい。かかる手段・方法の例としては、トリプシン／ＥＤＴＡ、コラゲナーゼ、Cell Dissociation Buffer（GIBCO Invitrogen）などの酵素またはキレート剤により細胞を遊離させること、スクレーバーなどを用いて物理的に細胞を掻き取ること、あるいは細胞回収用温度応答性培養器材（例えば、レプセル（CellSeed））にて細胞を培養後、例えば、２０℃で３０分間インキュベーションして細胞を剥離させる方法などがある。未分化細胞を浮遊化させた状態で培養することにより、上記肝小葉様細胞塊が形成される。

【００４５】

本発明は、もう１つの態様において、上記方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊に関するものである。上述の通り、本発明の肝小葉様細胞塊は肝細胞を含む。例えば、肝硬変などの肝機能の低下により生じる疾患またはその素因を有する対象または該対象と同種のものの脂肪組織から採取した細胞を用いて上記方法を行い、得られた肝小葉様細胞塊を該対象に移植することで、肝硬変などの肝機能の低下により生じる疾患を治療または予防することなどが可能である。

【００４６】

本発明は、さらなる態様において、上記方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊に含まれる肝細胞に関するものである。

【００４７】

本発明は、なおさらなる態様において、上記方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊および／またはかかる肝小葉様細胞塊に含まれる肝細胞を含む、肝機能の低下により生じる疾患を予防または治療するための医薬組成物に関するものである。肝機能の低下により生じる疾患とは、肝臓の機能の低下のみならず機能不全により生じる疾患を含み、例えば、肝炎、肝硬変、肝癌、肝不全、薬剤性肝障害、アルコール性肝障害、先天性代謝異常、胆汁うっ滞性肝障害などである。本発明の医薬組成物において、肝小葉様細胞塊または肝細胞はＰＢＳのような適当な溶液中に懸濁されていてもよい。また、本発明の医薬組成物は、肝小葉様細胞塊または肝細胞の他、それらの肝臓への生着を促進させる物質、肝機能改善薬、適当な添加剤、賦形剤などを含んでいてもよい。

【００４８】

本発明は、別の態様において、上記培養方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊および／またはかかる肝小葉様細胞塊に含まれる肝細胞を対象に投与することを特徴とする、肝機能の低下により生じる疾患の治療または予防方法に関するものである。拒絶反応等の点から、好ましくは、同一種、あるいは自己の脂肪組織由来細胞から得ることのできる肝小葉様細胞塊または肝細胞が本発明において用いられる。肝小葉様細胞塊または肝細胞は、例えば、腎皮膜下、経門脈的に肝臓内、大網内、腹腔内、脾臓内、皮下などに移植ま

たは注射されてもよい。対象は、いずれのものであってもよく、ヒト対象であってもよいし、ヒト以外の対象、例えば、マウス、サルなどの哺乳類であってもよい。肝小葉様細胞塊または肝細胞の投与量、投与回数などは、例えば、対象の状態、疾患の重篤度などの種々の因子に応じて適宜選択される。

【００４９】

本発明はさらに、肝小葉細胞塊および／またはかかる肝小葉様細胞塊に含まれる肝細胞を投与することを特徴とする、血中ビリルビン濃度を低減させる方法に関するものである。かかる方法は、in vivoおよびin vitroのいずれにおいて行われてもよい。

【００５０】

本発明は、さらに別の態様において、脂肪組織を培養して肝小葉様細胞塊を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、肝小葉様細胞塊の形成が、候補物質不含系における形成と比較して促進されている場合に、該候補物質が肝小葉の形成を促進する物質であることを示す、肝小葉の形成を促進する物質をスクリーニングする方法に関するものである。上述の通り、肝小葉様細胞塊には肝細胞が含まれるので、かかる方法は、肝細胞への分化を促進する物質のスクリーニング方法も包含する。候補物質としては種々のものがあり、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、またはオンコスタチンＭのアナログまたは誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。脂肪組織から肝小葉様細胞塊を得る際の候補物質の培地への添加は、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程、および未分化細胞から肝小葉様細胞塊を得る工程のいずれか、あるいは両方で１回または複数回行われてもよい。

【００５１】

肝小葉様細胞塊の形成は、例えば、顕微鏡観察により形成された肝小葉様細胞塊の数を計測すること、培養上清中に分泌されたα－フェトプロテイン、アルブミンなどを例えば、ＥＬＩＳＡを用いて定量すること、α－フェトプロテイン、アルブミン、ＣＹＰ１Ｂ１、グルタミン合成酵素、ケラチン１８、ケラチン１９などの遺伝子の発現を定量的ＰＣＲにより測定すること、あるいは肝小葉への分化・形成に伴い発現が現象または増加することが分かっているマーカー物質、例えば、トランスサイレチン、α１－抗トリプシン、チロシンアミノトランスフェラーゼ、グルコース－６－ホスファターゼなどを定量的ＰＣＲまたはＥＬＩＳＡなどにより測定することなどにより、調べることができる。

【００５２】

従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、肝小葉の形成を促進する物質に関するものである。かかる物質を本発明の脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法に用いて、得られる肝小葉様細胞塊の数を増加させてもよいし、肝小葉様細胞塊の形成速度を増大させてもよい。または、かかる物質を、肝機能の低下により生じる疾患の治療または予防に用いてもよい。

【００５３】

本発明のさらに別の態様は、脂肪組織由来細胞を培養して肝小葉様細胞塊を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、肝小葉様細胞塊の形成が、候補物質不含系における形成と比較して抑制されている場合に、該候補物質が肝小葉の形成を抑制する物質であることを示す、肝小葉の形成を抑制する物質をスクリーニングする方法に関するものである。上述の通り、肝小葉様細胞塊には肝細胞が含まれるので、かかる方法は、肝細胞への分化を抑制する物質のスクリーニング方法も包含する。候補物質としては、種々のものがあり、例えば、四塩化炭素、フェノバルビタールなどの肝毒性を有する薬剤のアナログまたは誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。かかるスクリーニング方法により得ることのできる物質は、肝機能の亢進により生じる疾患の治療または予防に適していると考えられる。候補物質の培地への添加、肝小葉様細胞塊の形成を調べる手段・方法については上述の通りである。

【００５４】

従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、肝小葉の形成を抑制する物質に関するものである。

【００５５】
本発明は、なおさらに別の態様において、肝小葉の形成を促進または抑制する物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。本発明のキットは、脂肪組織からの細胞取得手段、培地、培養容器、ならびに肝小葉様細胞塊の形成を調べる手段等を含んでいてもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。かかるキットを用いて、上記スクリーニングを迅速かつ容易に行うことができる。
【００５６】
本発明は、もう１つの態様において、脂肪組織由来細胞を培養して得られた肝小葉様細胞塊を候補物質を含む培地中で培養し、肝小葉様細胞塊の活性が、候補物質不含系における活性と比較して増大している場合に、該候補物質が肝小葉の活性を上昇させる物質であることを示す、肝小葉の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法に関するものである。肝小葉の活性とは、肝小葉の解毒作用、タンパク質合成能、代謝作用などをいう。
【００５７】
肝小葉様細胞塊の活性の上昇は、例えば、培養上清中に分泌されたα－フェトプロテイン、アルブミンなどをＥＬＩＳＡなどを用いて定量し、かかるタンパク質量の増減により、あるいはα－フェトプロテイン、アルブミン、ＣＹＰ１Ｂ１、グルタミン合成酵素、ケラチン１８、ケラチン１９などの遺伝子の発現を定量的ＰＣＲにより測定し、かかる遺伝子の発現の増減により、調べることができる。候補物質としては種々のものがあり、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子、肝細胞増殖因子、またはオンコスタチンＭのアナログまたは誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。候補物質の培地への添加は、１回または複数回行われてもよい。
【００５８】
従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、肝小葉の活性を上昇させる物質に関するものである。かかる物質を本発明の脂肪組織由来細胞から肝小葉様細胞塊を得る方法に用いて、得られる肝小葉様細胞塊の活性を増大させてもよい。または、かかる物質を、肝機能の低下により生じる疾患の治療または予防に用いてもよい。
【００５９】
本発明は、別の態様において、脂肪組織由来細胞を培養して得られた肝小葉様細胞塊を候補物質を含む培地中で培養し、肝小葉様細胞塊の活性が、候補物質不含系における活性と比較して低減している場合に、該候補物質が肝小葉の活性を低減させる物質であることを示す、肝小葉の活性を低減させる物質をスクリーニングする方法に関するものである。候補物質としては種々のものがあり、例えば、四塩化炭素、フェノバルビタールのアナログまたは誘導体などが挙げられるが、これらに限定されない。候補物質の培地への添加、肝小葉様細胞塊の活性を調べる手段・方法については上述の通りである。
【００６０】
従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、肝小葉の活性を低減させる物質に関するものである。
【００６１】
以下に実施例を示して本発明を詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものではない。
【実施例１】
【００６２】
ＡＤＭＰＣの調製
インフォームドコンセントを受けた対象１０人（男性４人および女性６人）から、胃癌手術中に余分な脂肪組織を摘出した。プロトコールは、Osaka University Graduate School of Medicine Review Boards for Human Researchに準ずるものであった。全ての対象を少なくとも１０時間絶食させた。対象の年齢は５５±５歳（平均±ＳＥ；範囲４０～６０歳）であった。ステロイド剤またはＴＺＤの投与を受けている対象はいなかった。対象から、腹部皮下（筋膜表面の外側）脂肪組織および大網脂肪組織１～１０ｇを得た。脂肪

組織を刻み、次に、０．０７５％　コラゲナーゼ（Sigma Chemical Co.）含有ハンクス緩衝塩類溶液（ＨＢＳＳ）中、３７℃のウォーターバスにて振盪しながら１時間消化した。消化産物をＣｅｌｌ　Ｓｔｒａｉｎｅｒ（BD Bioscience）で濾過し、８００ｇにて１０分間遠心した。Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（ｄ＝１．０７７）（Nycomed）を用い、比重法により赤血球を除去し、得られた前脂肪組織由来多系統前駆細胞集団を１０％　ウシ胎児血清（Hyclone）を含むＤＭＥＭ中に細胞を播種した。２４時間培養して細胞を付着させ、洗浄後、ＥＤＴＡで処理して、ＡＤＭＰＣを得た。次に、ＡＤＭＰＣを、培地Ｉ：６０％　ＤＭＥＭ－低グルコース、４０％　ＭＣＤＢ２０１、１０μｇ／ｍＬ　ＥＧＦ、１ｎＭ　デキサメサゾン、１００μＭ　アスコルビン酸、および５％　ＦＢＳ中、密度１０，０００細胞／ｃｍ^{2}にてヒトフィブロネクチンコートディッシュに播種し、３から５継代し、実験に用いた（図１）。

【００６３】

ＡＤＭＰＣの特徴決定

ＡＤＭＰＣにおける遺伝子の発現をＲＴ－ＰＣＲにより調べた。対照として、特表２００５－５０２３５２号公報記載の方法により得られた脂肪組織由来幹細胞（以下、「ＡＤＳＣ」という）を用いた。ＲＴ－ＰＣＲを、以下の通りに行った。得られた細胞から、Ｍａｇ－Ｅｘｔｒａｃｔｏｒキット（TOYOBO）を用いて製造元の推奨プロトコールに従い、トータルＲＮＡを単離した。トータルＲＮＡ５００ｎｇをＤＮａｓｅ処理し、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ逆転写酵素ＲＮａｓｅ　Ｈ（－）（Invitrogen）を用いて、ｃＤＮＡを合成した。Ｉｓｌｅｔ－１、Ｎｋｘ２．５、ＧＡＴＡ－４、α－ＣＡ、ＭＬＣ、ＭＨＣ、およびＧＡＰＤＨについて、ＫＯＤ－ｐｌｕｓ（TOYOBO）を用いて、以下の条件でＲＴ－ＰＣＲを行った：９４℃で２分間変性、次に、９４℃で１５秒間の変性、予め決定した温度で３０秒間のアニーリング、６８℃で３０秒間の伸長を４０サイクル。各遺伝子についてのアニーリング温度およびプライマー配列を表１に示す。得られた増幅産物を２％　アガロースゲルにて電気泳動した。結果を図２および３に示す。ＡＤＭＰＣが未分化マーカーであるＩｓｌｅｔ－１を発現していること、ならびに心筋芽細胞のマーカーであるα－ＣＡおよびＭＬＣを発現していないことを確認した。

【００６４】

【表１】

遺伝子	プライマー配列	配列番号	アニーリング温度（℃）
Ｉｓｌｅｔ－１	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	１	６０
	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG	２	
Ｎｋｘ２．５	GGTGGAGCTGGAGAAGACAGA	３	６０
	CGACGCCGAAGTTCACGAAGT	４	
ＧＡＴＡ－４	ACCAGCAGCAGCGAGGAGAT	５	６０
	GAGAGATGCAGTGTGCTCGT	６	
α－ＣＡ	GGAGTTATGGTGGGTATGGGTC	７	６０
	AGTGGTGACAAAGGAGTAGCCA	８	
ＭＬＣ－２ｖ	GCGCCAACTCCAACGTGTTCT	９	６０
	GTGATGATGTGCACCAGGTTC	１０	
ＭＨＣ	GGGGACAGTGGTAAAAGCAA	１１	６０
	TCCCTGCGTTCCACTATCTT	１２	
ＧＡＰＤＨ	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	１３	６０
	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG	１４	

【００６５】

さらに、ＡＤＭＰＣについてＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｙｏｓｙｓｔｅｍｓ　７９００　Ｆａｓｔ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲシステムにてリアルタイムＰＣＲ（詳細は、後述する

）を行い、未分化マーカーであるＳｃａ－１およびＡＢＣＧ２の発現を調べた。用いたＴａｑＭａｎプローブを表２に示す。結果を図４および５に示す。ＡＤＭＰＣがＳｃａ－１およびＡＢＣＧ２を発現していることを確認した。

【００６６】

【表２】

遺伝子名	参照配列	アッセイＩＤ
Ｓｃａ－１	ＮＭ＿０００３３２．２	Ｈｓ００１６５６５６＿ｍ１
ＡＢＣＧ２	ＮＭ＿００４８２７．２	Ｈｓ００１８４９７９＿ｍ１

【００６７】

ＡＤＭＰＣ　２×１０^{5}個を０．５％　ホルマリン－ＰＢＳ溶液で４℃にて３０分間固定した。ＰＢＳで５０倍希釈した１次抗体（抗ＳＳＥＡ－４抗体（Chemicon））を添加し、４℃にて４５分間反応させた。反応後、２次抗体（抗マウスＩｇＧ抗体－ＰＥ（ベクトン・ディッキンソン））を添加し、４℃にて４５分間反応させ、ＦＡＣＳ分析を行った。対照として、１次抗体としてマウスＩｇＧ抗体（ベクトン・ディッキンソン）を用いた。結果を図６に示す。ＡＤＭＰＣがＳＳＥＡ－４を発現していることが確認できた。

【実施例２】

【００６８】

ＡＤＭＰＣから心筋芽細胞への分化・誘導

ＤＭＳＯ（群１）、またはＯＰ９培養上清（群２）を含む培地ＩにてＡＤＭＰＣを１４日間培養し、得られた細胞における遺伝子の発現を上述の通りＲＴ－ＰＣＲにより調べた。対照として、培地Ｉにて培養したＡＤＭＰＣを用いた。結果を図７に示す。群１および２の細胞において、心筋芽細胞のマーカーであるα－ＣＡおよびＭＬＣが発現していること、すなわち、ＡＤＭＰＣが心筋芽細胞へと分化・誘導されたことが確認できた。

【００６９】

心筋芽細胞への分化・誘導期間の検討

次に、ＡＤＭＰＣをＤＭＳＯ存在下で１、２、３、４、５、７、１０、１４日間培養して、心筋芽細胞への分化を調べた。対照としてＡＤＭＰＣおよび心筋細胞を用いた。結果を図８から１２に示す。ＤＭＳＯ存在下で培養することにより、心筋芽細胞を得られることが分かった。

【００７０】

心筋芽細胞を含むシートの作成

得られた心筋芽細胞を、ＤＭＳＯを含む培地Ｉ中、温度感受性培養皿（株式会社セルシードより供与）中３７℃にて培養し、細胞塊を形成させた。２０℃以下にて３０分間インキュベーションすることにより、細胞塊を剥離させ、心筋芽細胞を含むシートを得た（図１３参照）。得られたシートを以下の移植実験に用いた。

【００７１】

心筋梗塞モデルラットへのシートの移植

ヌードラットの冠動脈を結紮することにより、心筋梗塞モデルラットを作成した。次に、傷害領域に心筋芽細胞を含むシートを移植した。移植後２週間および１０週間における心機能を、エコーにより、拡張末期径（ＬＶＤｄ）、収縮末期径（ＬＶＤｓ）、左室駆出率（％ＥＦ）および左室内径短縮率（％ＦＳ）を計測して、評価した。対照として、上記同様形成させたＡＤＭＰＣを含むシートを用いた。結果を図１４から１９に示す。心筋芽細胞を含むシートを移植して２週間および１０週間後のラットにおいて、壁運動を確認し、心機能が著しく改善されていることが分かった。これに対し、ＡＤＭＰＣを含むシートを移植したラットにおいて、２週間後では壁運動を確認したが、１０週間後では確認できなかった。

【００７２】

シートを移植した心臓の組織解析

移植後１２週間にラットを犠牲死させて、心臓を摘出した。摘出した心臓を４％　パラホルムアルデヒド液で固定した後、７０％　エタノールに置換した。固定した心臓を数ミリ幅に切り出し、パラフィンで固めてブロックを作製した。得られたパラフィンブロックをミクロトームを用いて２μｍに薄切し、スライドガラスに張り付け、乾燥させた。得られた薄切片についてヘマトキシリン・エオジン染色および免疫組織染色を以下の通り行った。

【００７３】

１．ヘマトキシリン・エオジン染色

薄切片を脱パラフィンし、水で洗浄した。ヘマトキシリン液で１０分間染色し、ぬるま湯で３分間色だしした。水洗後、エオジンで５分間染色した。アルコールで分別、脱水した。キシレンで透徹後封入し、顕微鏡にて観察した。結果を図２０および２１に示す。移植したシートが生着していることが確認できた。

【００７４】

２．免疫組織染色

薄切片を脱パラフィンし、水で洗浄した。免疫賦活処理し、１０％　正常ヤギ血清を添加したＴＢＳ－Ｔに浸漬し、４℃にて２４時間ブロッキングした。ＴＢＳ－Ｔで洗浄後、１０％　正常ヤギ血清を添加したＴＢＳ－Ｔで１００倍希釈した１次抗体を試料に滴下し、３７℃で１時間反応させた。１次抗体として、抗ヒトα－ｃＡ抗体（AmericanResearch Products,Inc）、抗ヒトＭＨＣ抗体（Upstate cell signaling solutions）および抗ヒトＨＬＡ－ＡＢＣ抗体（株式会社　ホクドー）を用いた。ＴＢＳ－Ｔで洗浄後、シンプルステインラットＭＡＸ－ＰＯ（株式会社ニチレイバイオサイエンス）を滴下し、室温で３０分間反応させた。ＴＢＳ－Ｔで洗浄後、シンプルステインＡＥＣ溶液（株式会社ニチレイバイオサイエンス）を滴下し、検鏡しながら発色させた。水で洗浄後、ヘマトキシリン液で３分間染色し、核染色を行った。水で洗浄後、非水溶性封入剤（株式会社ニチレイバイオサイエンス）を滴下し、カバーガラスで封入し、顕微鏡にて観察した。結果を図２２から２７に示す。心筋芽細胞を含むシートを移植した部位が、ＨＬＡ－ＡＢＣ陽性、すなわちヒト由来であり、α－ＣＡおよびＭＨＣを発現していることが確認できた。従って、移植した心筋芽細胞が心筋細胞に分化転換していることが分かった。

【実施例３】

【００７５】

ＡＤＭＰＣの多分化能の確認

１．膵臓細胞への分化能

ＡＤＭＰＣを国際公開公報ＷＯ２００７／０３９９８６に記載の方法により、膵内分泌細胞へ分化させた。得られた膵内分泌細胞を図２８に示す。ＡＤＭＰＣは、膵内分泌細胞に分化できること、すなわち、膵前駆細胞としての機能を有することを確認した。また、かかるＡＤＭＰＣから膵内分泌細胞への分化の効率は、ＡＤＳＣからのものと比較して高いものであった（データは示していない）。

【００７６】

２．肝細胞への分化能

肝前駆細胞を肝芽細胞・肝細胞へと分化させることが知られているＤＭＳＯ（０．１％）、ＨＧＦ（１０ｎｇ／ｍＬ）、ｂＦＧＦ（１０ｎｇ／ｍＬ）、およびオンコスタチンＭ（１０ｎｇ／ｍＬ）を培地Ｉに添加して培地ＩＩを調製した。ＡＤＭＰＣを培地ＩＩ中で１４日間培養し、肝細胞を得た。得られた肝細胞を図２９に示す。ＡＤＭＰＣは、肝細胞へと分化できること、すなわち、肝前駆細胞としての機能を有することを確認した。また、ＡＤＭＰＣから肝細胞への分化の効率は、ＡＤＳＣからのものと比較して高いものであった（データは示していない）。

【００７７】

さらに、得られた肝細胞についてＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｙｏｓｙｔｅｍｓ　７９００　Ｆａｓｔ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲシステムにてリアルタイムＰＣＲ（詳細は、後述する）を行い、肝細胞への分化を示すマーカーであるα－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、ア

ルブミン、ＣＹＰ１Ｂ１、グルタミン合成酵素の発現を調べた。対照として、ＡＤＭＰＣを用いた。結果を図３０～３３に示す。これらの遺伝子の発現が、得られた肝細胞において上昇していることが確認できた。

【００７８】

３．脂肪細胞への分化能

ＡＤＭＰＣを、脂肪細胞分化剤であるＰＰＡＲ－γアゴニストを用いて培養し、脂肪細胞へ分化させた。得られた脂肪細胞をオイルレッドＯ染色し、脂質含有量を測定した。対照としてＡＤＳＣを用いた。結果を図３４に示す。ＡＤＭＰＣは、脂肪細胞へと分化できること、すなわち、脂肪前駆細胞としての機能を有することが分かった。また、かかる分化の効率は、ＡＤＳＣと比較して高いものであった。以上より、ＡＤＭＰＣが多系統細胞に分化する能力を有する細胞であることを確認した。

【実施例４】

【００７９】

脂肪組織由来細胞の単離および培養

ヒト脂肪組織を大きさ２～３ｍｍ^{2}の断片に刻み、コラゲナーゼＩを用いて消化した。消化物を、１０％　ＦＢＳおよび抗生剤を含むＤＭＥＭにて２４～３６時間培養し、０．０２％　ＥＤＴＡで処理して、脂肪組織由来細胞を得た。得られた脂肪組織由来細胞を６０％　ＤＭＥＭ（低グルコース）、４０％　ＭＣＤＢ２０１、１×ＩＴＳ（１０．０ｍｇ／Ｌ　インスリン、５．５ｍｇ／Ｌ　トランスフェリン、６．７ｎｇ　亜セレン酸ナトリウム）、１０ｎｇ／ｍＬ　ｒｈＥＧＦ、１ｎＭ　デキサメサゾン、０．１ｍＭ　アスコルビン酸、および５％　ＦＣＳ（Hyclone）を含む培地中、フィブロネクチンコートディッシュで３～５継代培養して拡大した。脂肪組織由来細胞の顕微鏡像を図３５に示す。

【００８０】

脂肪組織由来細胞からの未分化細胞の取得

脂肪組織由来細胞を０．２５％　トリプシン／ＥＤＴＡ（ナカライテスク）で処理して解離させ、単一化した細胞を、２０％　ＦＣＳ、１ｍＭ　グルタミン（GIBCO Invitrogen）、および１％　非必須アミノ酸（GIBCO Invitrogen）を含むノックアウトＤＭＥＭ（GIBCO Invitrogen）中、低接着培養ディッシュ（Hydrocell;セルシード）にて２～３日間培養した。細胞は自己凝集し、アディポスフェアを形成した。アディポスフェアの顕微鏡像を図３６に示す。

【００８１】

未分化細胞からの肝小葉様細胞塊の形成

得られたアディポスフェアを、ＰＢＳにて２～３回洗浄（１０００～１２００ｒｐｍにて遠心）し、６０％　ＤＭＥＭ（低グルコース）、４０％　ＭＣＤＢ２０１、１×ＩＴＳ、１ｎＭ　デキサメサゾン、１００μＭ　アスコルビン酸、１０ｎｇ／ｍＬ　ｒｈＥＧＦ、ｂＦＧＦ、ＨＧＦおよびＯＳＭ（オンコスタチンＭ）を含む培地中、低接着培養ディッシュ（Hydrocell;セルシード）にて３～４週間培養した。培養開始の１０日目から０．１％　ＤＭＳＯを添加して、肝小葉様細胞塊を得た。得られた肝小葉様細胞塊の顕微鏡像を図３７に示す。

【実施例５】

【００８２】

肝小葉様細胞塊の肝細胞遺伝子発現特性

１．ＲＮＡの抽出

肝小葉様細胞塊からのＲＮＡの抽出を、ＲＮｅａｓｙ　Ｐｒｏｔｅｃｔ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ（QIAGEN）を用いて、以下の通り行った。肝小葉様細胞塊を回収し、１０μｌ／ｍｌ　２－メルカプトエタノール（Naacalai Tesqu）を含むバッファーＲＬＴを６００μｌ／１０^{7}細胞の割合で加えた。２０Ｇ針でピペッティングして、細胞をホモジェナイズし、次に、７０％　エタノール６００μｌを添加した。得られた混合液７００μｌを2ｍｌのコレクションチューブ内のＲＮｅａｙ　Ｍｉｎｉカラムに移し、１０００ｒｐｍにて１５秒間遠心した。次に、バッファーＲＷ１　３５０μｌをカラムに添加し、１０００ｒｐｍ

にて１５秒間遠心した。ＤＮａｓｅ Ｉストック溶液（QIAGEN）１０μｌを、バッファーＲＤＤ ７０μｌに添加して転倒混和し、ＲＮｅａｓｙ Ｍｉｎｉカラム内のＲＮｅａｓｙシリカゲルメンブレンに添加し、室温で１５分間インキュベーションした。バッファーＲＷ１ ３５０μｌを添加し、１０００ｒｐｍにて１５秒間遠心した。２ｍｌコレクションチューブを新たなものに交換した。カラムにバッファーＲＰＥ ５００μｌを添加し、１０００ｒｐｍにて１５秒間遠心した。さらに、バッファーＲＰＥ ５００μｌを添加し、１０００ｒｐｍにて２分間遠心し、次に、１５００ｒｐｍにて１分間遠心した。カラムを１．５ｍｌコレクションチューブに移し、ＲＮａｓｅ ｆｒｅｅ ｗａｔｅｒ３０～５０μｌをＲＮｅａｓｙシリカゲルメンブレンに添加し、１０００ｒｐｍにて１分間遠心し、ＲＮＡを抽出した。

【００８３】

２．１本鎖ｃＤＮＡの作成

抽出したＲＮＡ溶液１１．５μｌに、０．５ｍＭ Ｒａｎｄｏｍ Ｐｒｉｍｅｒ（Invitorogen）０．５μｌおよび１０ｍＭ ｄＮＴＰｍｉｘ（Invitorogen）１μｌを添加し、６５℃にて５分間反応させ、次に、氷上で冷却した。得られた混合物に５×Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄバッファー（Invitorogen）４μｌ、０．１Ｍ ＤＴＴ（Invitorogen）１μｌ、ＲＮａｓｅＯＵＴ（Invitorogen）１μｌ、およびＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＩＩ ＲＴ（Invitorogen）１μｌを添加し、２５℃で５分間、５０℃で６０分間、７０℃で１５分間反応させ、１本鎖ｃＤＮＡを作成した。得られたｃＤＮＡを使用まで４℃にて保存した。

【００８４】

３．リアルタイムＰＣＲ

作成したｃＤＮＡ ９μｌに、ＴａｑＭａｎ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ ＰＣＲ Ｍａｓｔｅｒ Ｍｉｘ（Applied Biosystems）１０μｌおよびＴａｑＭａｎ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ａｓｓａｙｓ（Applied Biosystems）１μｌを添加した。Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｙｏｓｙｔｅｍｓ ７９００ Ｆａｓｔ Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ ＰＣＲシステムにて次の条件でリアルタイムＰＣＲを行った：９５℃で１０分間変性、９５℃で１５秒間および６０℃で１分間を４０サイクル。α－フェトプロテイン、アルブミン、ＣＹＰ１Ｂ１、ＣＹＰ２Ｂ６、グルタミン合成酵素、ケラチン１８およびケラチン１９について用いたＴａｑＭａｎプローブを以下の表３に示す。また、内部標準としてＧＡＰＤＨ（Applied Biosystems）を用いた。対照試料として、Seo MJ. et al., 2005 Mar 4; 328(1): 258-64記載の方法により得られた肝細胞（「従来法」と表す）、線維芽細胞、ＨｅｐＧ２、および脂肪組織由来細胞（「ＡＤＳＣ」と表す）を用いた。結果を図３８～４３に示す（図中の縦軸は、蛍光強度を示す）。本発明の方法により得られた肝小葉様細胞塊が、従来法で得られた肝細胞と比較して、α－フェトプロテイン、アルブミン、ケラチン１８、ケラチン１８、ケラチン１９、ＣＹＰ１Ｂ１およびグルタミン合成酵素を高発現することが分かった。また、アルブミンを除くこれらの遺伝子の発現は、ＨｅｐＧ２におけるものより有意に高かった。

【００８５】

【表３】

遺伝子名	参照配列	アッセイＩＤ
α－フェトプロテイン	NM_001134	Hs00173490_m1
アルブミン	NM_000477	Hs00609411_m1
チトクロムＰ４５０、ファミリー１、サブファミリーＢ、ポリペプチド１（ＣＹＰ１Ｂ１）	NM_000104	Hs00164383_m1
チトクロムＰ４５０、ファミリー２、サブファミリーＢ、ポリペプチド６	NM_000767	Hs00167937_g1
グルタミン合成酵素	NM_002065	Hs00374213_m1
ケラチン１８	NM_199187/NM_000224	Hs01941416_g1
ケラチン１９	NM_002276	Hs00761767_s1

【実施例６】

【００８６】

肝小葉様細胞塊による肝性タンパク質の産生

Ａ．ウエスタンブロット分析

１．試料の調製

肝小葉様細胞塊をＰＢＳ（Nacalai Tesque）で３回洗浄し、次に、Ｍ－ＰＥＲ（PIERCE）を添加した。細胞を超音波破砕にて溶解し、１４０００ｇにて１５分間遠心して、未溶解の細胞成分を除去した。試料と当量のサンプルバッファー（Nacalai Tesque）を添加し、１００℃にて５分間ボイルし、氷冷した。得られた試料のタンパク質濃度を、ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｒｅａｇｅｎｔ（PIERCE）を用いて測定した。

【００８７】

２．ＳＤＳ－ＰＡＧＥ

電気泳動用ゲルミニプレート（ＰＡＧ ミニ「第一」；第一化学薬品）、ランニングバッファーを用いて、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを行った。用いたタンパク質の量は、５μｇであった。泳動条件は、スタッキングゲル中は１０ｍＡ、ランニングゲル中は４０ｍＡとした。

【００８８】

３．ウェスタンブロット

上記の泳動したゲルをブロティングバッファーで１０分間洗浄した。次に、ゲル中のタンパク質を、Ｗｅｔ式ブロティング（１００ｍＡ、一晩）にてニトロセルロースメンブレンに写し取った。

【００８９】

４．免疫染色

メンブレンを０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳにて１０分間洗浄した。ブロッキングワン（Nacalai Tesque）を用いて室温で１時間反応させた。１次抗体として、Ｈｕｍａｎ Ａｌｂｕｍｉｎ抗体（BETHYL）またはＡｌｐｈａ Ｆｅｔｏｐｒｏｔｅｉｎ Ａｂ－２（LAB Vision）の５００倍希釈液と１時間反応させた。０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳにて１５分間洗浄した（３回）。２次抗体として、ポリクローナルブタ抗ウサギ免疫グロブリン／ＨＲＰまたはポリクローナルウサギ抗ヤギ免疫グロブリン／ＨＲＰの１０００倍希釈液と１時間反応させた。０．１％ Ｔｗｅｅｎ２０含有ＰＢＳにて１５分間洗浄した（３回）。ＥＣＬ Ｐｌｕｓ Ｗｅｓｔｅｒｎ Ｂｌｏｔｔｉｎｇ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔｓを用いてバンドを検出した。結果を図４４および４５に示す。本発明の方法により得られた肝小葉様細胞塊が、α－フェトプロテインおよびアルブミンを十分量産生することが分かった。

【００９０】

Ｂ．免疫組織化学染色

１．切片の作成

肝小葉様細胞塊をＰＢＳ（Nacali Tesque）で３回洗浄し、遠心した。得られたペレットをＴｉｓｓｕｅ－Ｔｅｋ　ＯＣＴ－ｃｏｍｐｏｕｎｄ（Sakura Fineteck Inc.）に包埋し、－３０℃で保存した。クリオスタットを用いて７μｍの切片を作成し、スライドガラスに貼付し、－３０℃にて保存した。

【００９１】

２．免疫組織化学染色

上記の切片をドライヤーで乾燥させ、４％　パラホルムアルデヒドにて３０分間固定した。ＰＢＳにて５分間３回洗浄した。ブロッキングワン（Nacalai Tesque）を用いて室温にて１時間反応させた。ＰＢＳで５分間３回洗浄した。１次抗体のポリクローナルウサギ抗ヒトアルブミン抗体（DAKO）の４００倍希釈液、またはポリクローナルウサギ抗ヒトα－１－フェトプロテイン抗体（DAKO）の３００倍希釈液と１時間反応させた。ＰＢＳで１０分間３回洗浄した。２次抗体のＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ［商標］４６６ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体（Molecular Probes）の５００倍希釈液と１時間反応させた。ＰＢＳで１０分間３回洗浄した。Ｐｅｒｍａ　Ｆｌｕｏｒ（日本ターナー）を用いて包埋し、顕微鏡にて観察した。結果を図４６および図４７に示す。肝小葉細胞塊におけるα－フェトプロテイン、およびアルブミンの存在を確認した。これにより、肝小葉細胞塊が実際にこれらのタンパク質を産生することが分かった。

【実施例７】

【００９２】

肝小葉様細胞塊による尿素の生成

１．尿素の生成

肝小葉様細胞塊を５ｍＭ　NH_4Cl含有ハンクス緩衝塩溶液（Gibco）５ｍｌ中で２時間インキュベーションした。上清０．５ｍｌの尿素濃度を、ＱｕａｎｔｉＣｈｒｏｍ　Ｕｒｅａ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Bioassay Systems）を用いて測定した。得られた濃度に上清の総体積をかけて、トータルの生成尿素量を計算した。対照としてＨｅｐＧ２を用いた。

【００９３】

２．ＤＮＡ量の測定

NH_4Cl含有ハンクス緩衝塩溶液を除去し、肝小葉様細胞塊をＰＢＳにて洗浄した。緩衝液を添加し、超音波破砕を行い、細胞をホモジェナイズした。細胞ホモジネート５０μｌに緩衝液１ｍｌを加え、さらに発色液５０μｌを添加して、攪拌した。得られた溶液の蛍光値を、励起：３５６ｎｍ、放出：４５８ｎｍにて測定し、ＤＮＡ濃度を決定した。ＤＮＡ濃度に、添加した緩衝溶液の体積をかけて総ＤＮＡを計算した。

【００９４】

３．生成尿素量

得られたトータルの生成尿素量を総ＤＮＡ量で割り、総生成尿素量を決定した。結果を図４８に示す。肝小葉様細胞塊がＨｅｐＧ２と比較して、十分量の尿素を産生したことが分かった。これにより、本発明により得られる肝小葉様細胞塊が十分な解毒作用を有することが確認できた。

【実施例８】

【００９５】

マウス肝炎モデルにおける肝小葉様細胞塊の移植効果

１．マウス肝炎モデルの作成

ＮＯＤ－ＳＣＩＤマウスに、四塩化炭素（CCl_4）を３００μｌ／ｋｇにて週２回、１２週間腹腔内注入し、マウス肝炎モデルを作成した。

【００９６】

２．肝小葉様細胞塊の移植

肝小葉様細胞塊をハンクス緩衝塩溶液で洗浄し、遠心してペレットとした。上記のマウスをセボフルエンにて麻酔した。左傍正中切開にて開復し、左腎臓を露出し、腎皮膜を剥離してポケットを作成した。作成したポケット内にペレット化した細胞塊を注入して移植

した。腹壁を２層にて閉腹した。
【００９７】
３．解析
移植１０日目に、マウスから採血し、血中ビリルビン濃度を測定した。結果を図４９に示す。肝小葉様細胞塊を移植した群は、移植しなかった群と比較して、血中ビリルビン濃度が低減されることが分かった。これにより、本発明の方法により得ることのできる肝小葉様細胞塊が、肝機能の低下により生じる疾患の治療に有効であることが分かった。
【産業上の利用可能性】
【００９８】
本発明により、心筋芽細胞を含むシート、心筋芽細胞および心筋芽細胞を含むシートを得る方法などが得られるので、心不全などの心筋の機能低下により生じる疾患の予防または治療分野、ならびに心機能を改善する物質のスクリーニングなどにおいて有用である。
【図面の簡単な説明】
【００９９】
【図１】図１は、脂肪組織から得られたＡＤＭＰＣの顕微鏡像である。
【図２】図２は、ＡＤＭＰＣおよびＡＤＳＣを３継代したときの、ＲＴ－ＰＣＲの結果を示すものである。
【図３】図３は、ＡＤＭＰＣを６継代したときの、ＲＴ－ＰＣＲの結果を示すものである。
【図４】図４は、ＡＤＭＰＣにおけるＳｃａ－１の発現量を示すグラフである。
【図５】図５は、ＡＤＭＰＣにおけるＡＢＣＧ２の発現量を示すグラフである。
【図６】図６は、ＡＤＭＰＣにおけるＳＳＥＡ－４の発現を示すＦＡＣＳ分析の結果である。
【図７】図７は、ＤＭＳＯまたはＯＰ９培養上清の存在下にて培養された細胞におけるＲＴ－ＰＣＲの結果を示すものである。
【図８】図８は、ＤＭＳＯ存在下にて培養した細胞におけるＮｋｘ２．５の発現を示すグラフである。
【図９】図９は、ＤＭＳＯ存在下にて培養した細胞におけるＧＡＴＡ－４の発現を示すグラフである。
【図１０】図１０は、ＤＭＳＯ存在下にて培養した細胞におけるα－ＣＡの発現を示すグラフである。
【図１１】図１１は、ＤＭＳＯ存在下にて培養した細胞におけるＭＬＣの発現を示すグラフである。
【図１２】図１２は、ＤＭＳＯ存在下にて培養した細胞におけるＭＨＣの発現を示すグラフである。
【図１３】図１３は、心筋芽細胞を含むシートの強拡像である。
【図１４】図１４は、心筋芽細胞を含むシートの移植後２週間および１０週間における心エコー図である。長い方の矢印は拡張期を、短い方の矢印は収縮期をそれぞれ表す。
【図１５】図１５は、ＡＤＭＰＣを含むシートの移植後２週間および１０週間における心エコー図である。長い方の矢印は拡張期を、短い方の矢印は収縮期をそれぞれ表す。
【図１６】図１６は、心筋芽細胞を含むシート（丸）、およびＡＤＭＰＣを含むシート（四角）を移植した心臓のＬＶＤｄの改善を示すグラフである。
【図１７】図１７は、心筋芽細胞を含むシート（丸）、およびＡＤＭＰＣを含むシート（四角）を移植した心臓のＬＶＤｓの改善を示すグラフである。
【図１８】図１８は、心筋芽細胞を含むシート（丸）、およびＡＤＭＰＣを含むシート（四角）を移植した心臓の％ＥＦの改善を示すグラフである。
【図１９】図１９は、心筋芽細胞を含むシート（丸）、およびＡＤＭＰＣを含むシート（四角）を移植した心臓の％ＦＳの改善を示すグラフである。
【図２０】図２０は、心筋芽細胞を含むシートを移植した心臓のＨＥ染色像（１００倍）である。

【図２１】図２１は、ＡＤＭＰＣを含むシートを移植した心臓のＨＥ染色像（１００倍）である。
【図２２】図２２は、心筋芽細胞を含むシートを移植した心臓を抗ヒトα－ＣＡ抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像（１００倍）である。
【図２３】図２３は、ＡＤＭＰＣを含むシートを移植した心臓を抗ヒトα－ＣＡ抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像（１００倍）である。
【図２４】図２４は、心筋芽細胞を含むシートを移植した心臓を抗ヒトＭＨＣ抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像（１００倍）である。
【図２５】図２５は、ＡＤＭＰＣを含むシートを移植した心臓を抗ヒトＭＨＣ抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像（１００倍）である。
【図２６】図２６は、心筋芽細胞を含むシートを移植した心臓を抗ヒトＨＬＡ－ＡＢＣ抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像（１００倍）である。
【図２７】図２７は、ＡＤＭＰＣを含むシートを移植した心臓を抗ヒトＨＬＡ－ＡＢＣ抗体を用いて免疫染色したときの、顕微鏡像（１００倍）である。
【図２８】図２８は、ＡＤＭＰＣを分化させて得られた膵内分泌細胞の顕微鏡像である。
【図２９】図２９は、ＡＤＭＰＣを分化させて得られた肝細胞の顕微鏡像である。
【図３０】図３０は、ＡＤＭＰＣを分化させて得られた肝細胞におけるα－フェトプロテインの発現量を示すグラフである。
【図３１】図３１は、ＡＤＭＰＣを分化させて得られた肝細胞におけるアルブミンの発現量を示すグラフである。
【図３２】図３２は、ＡＤＭＰＣを分化させて得られた肝細胞におけるＣＹＰ１Ｂ１の発現量を示すグラフである。
【図３３】図３３は、ＡＤＭＰＣを分化させて得られた肝細胞におけるグルタミン合成酵素の発現量を示すグラフである。
【図３４】図３４は、ＡＤＭＰＣを分化させて得られた脂肪細胞に含まれる脂質含有量を示すグラフである。
【図３５】図３５は、得られた脂肪組織由来細胞の顕微鏡像である。
【図３６】図３６は、得られたアディポスフェアの顕微鏡像である。
【図３７】図３７は、得られた肝小葉様細胞塊の顕微鏡像である。
【図３８】図３８は、α－フェトプロテインについての定量的ＲＴ－ＰＣＲの結果を示すグラフである。
【図３９】図３９は、アルブミンについての定量的ＲＴ－ＰＣＲの結果を示すグラフである。
【図４０】図４０は、ケラチン１８についての定量的ＲＴ－ＰＣＲの結果を示すグラフである。
【図４１】図４１は、ケラチン１９についての定量的ＲＴ－ＰＣＲの結果を示すグラフである。
【図４２】図４２は、ＣＹＰ１Ｂ１についての定量的ＲＴ－ＰＣＲの結果を示すグラフである。
【図４３】図４３は、グルタミン合成酵素についての定量的ＲＴ－ＰＣＲの結果を示すグラフである。
【図４４】図４４は、肝小葉様細胞塊により産生されたα－フェトプロテインについてのウェスタンブロット分析の結果である。
【図４５】図４５は、肝小葉様細胞塊により産生されたアルブミンについてのウェスタンブロット分析の結果である。
【図４６】図４６は、肝小葉様細胞塊におけるα－フェトプロテインの存在を免疫組織化学染色により示す顕微鏡像である。
【図４７】図４７は、肝小葉様細胞塊におけるアルブミンの存在を免疫組織化学染色により示す顕微鏡像である。
【図４８】図４８は、肝小葉様細胞塊により生成された尿素量を示すグラフである。

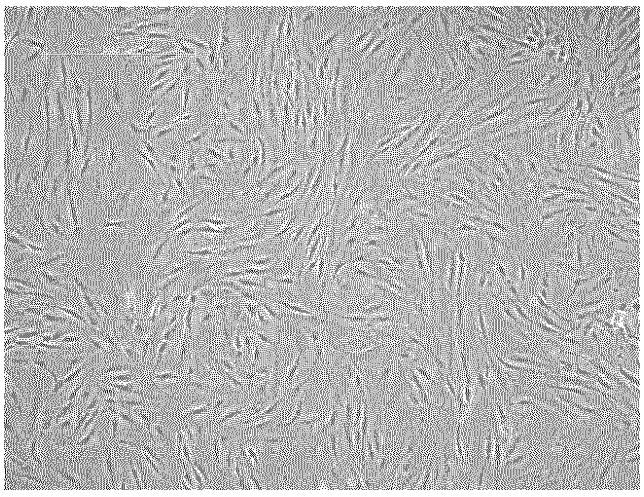
【図４９】図４９は、肝炎マウスモデルにおける肝小葉様細胞塊の移植による効果を示すグラフである。

【配列表フリーテキスト】

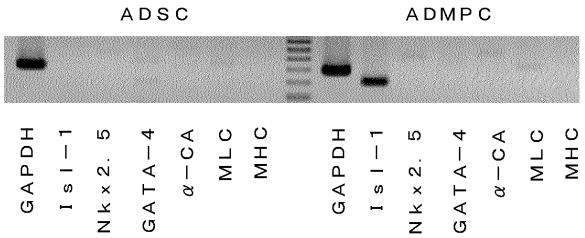
【０１００】

SEQ ID NO:1:Islet-1 forward primer
SEQ ID NO:2:Islet-1 reverse primer
SEQ ID NO:3:Nkx2.5 forward primer
SEQ ID NO:4:Nkx2.5 reverse primer
SEQ ID NO:5:GATA-4 forward primer
SEQ ID NO:6:GATA-4 reverse primer
SEQ ID NO:7:α-CA forward primer
SEQ ID NO:8:α-CA reverse primer
SEQ ID NO:9:MLC2v forward primer
SEQ ID NO:10:MLC2v reverse primer
SEQ ID NO:11:MHC forward primer
SEQ ID NO:12:MHC reverse primer
SEQ ID NO:13:GAPDH forward primer
SEQ ID NO:14:GAPDH reverse primer

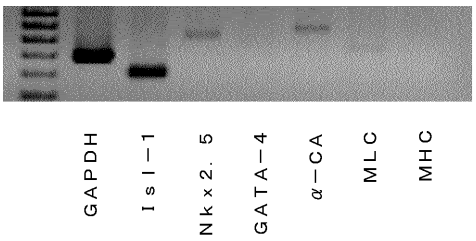
【図１】



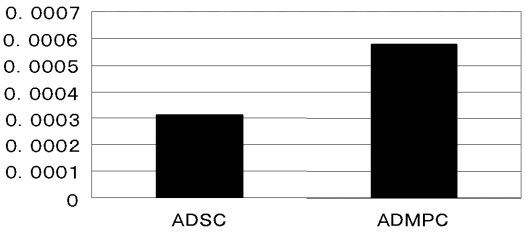
【図２】



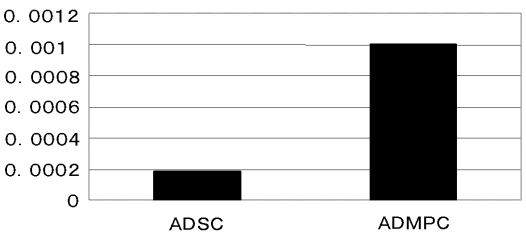
【図３】



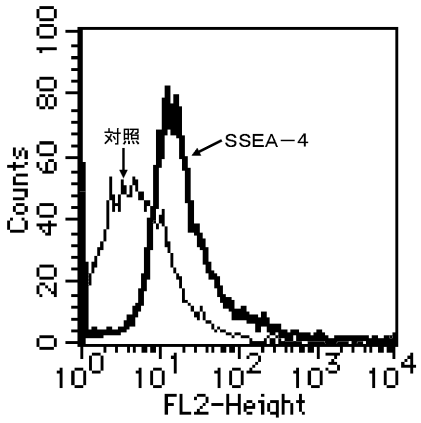
【図４】



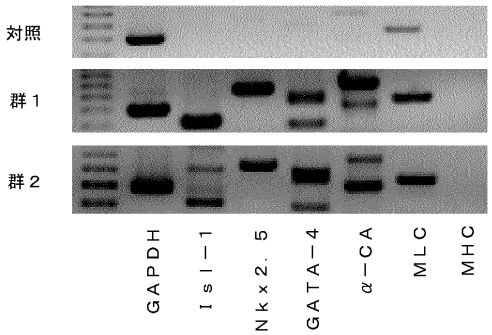
【図５】



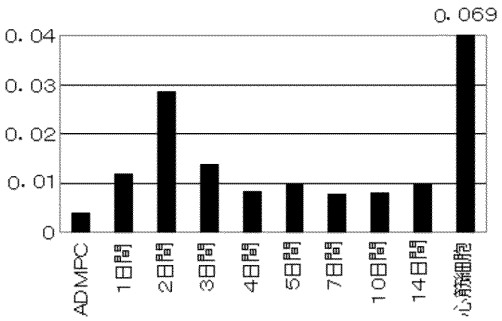
【図６】



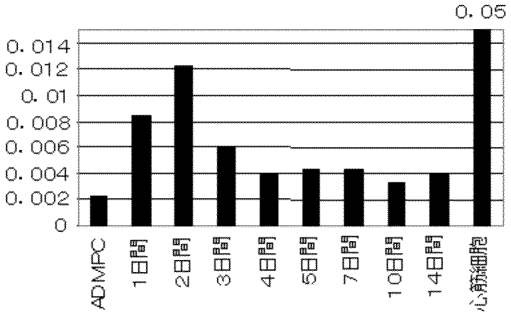
【図７】



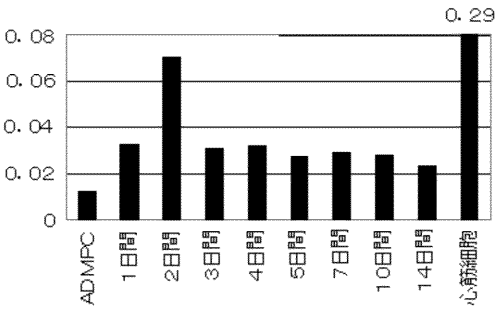
【図８】



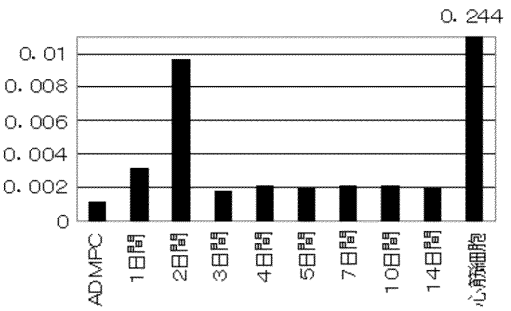
【図９】



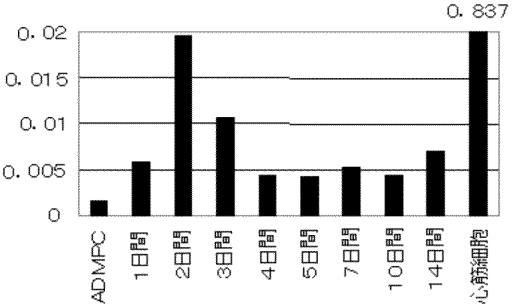
【図１０】



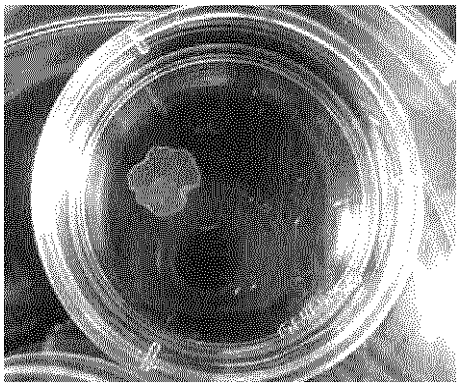
【図１１】



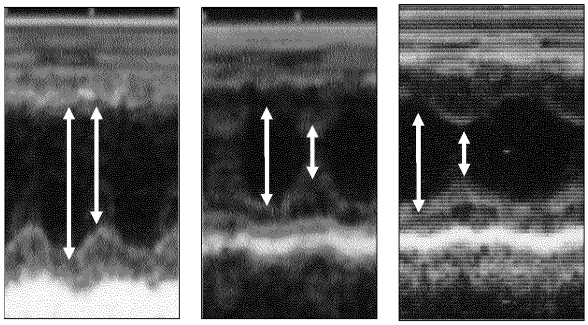
【図１２】



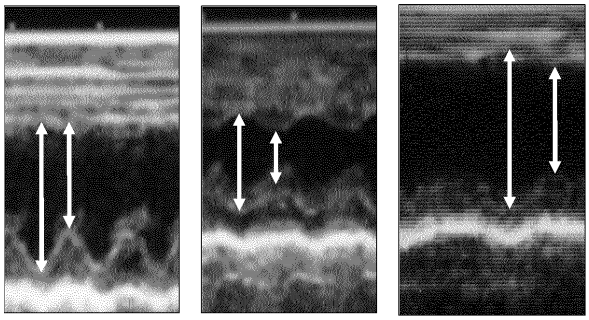
【図１３】



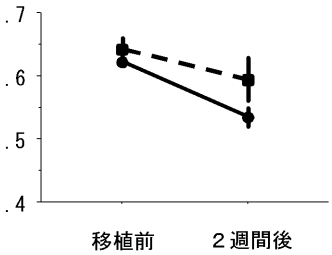
【図１４】



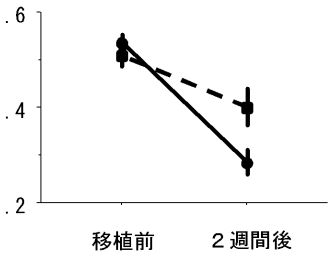
【図１５】



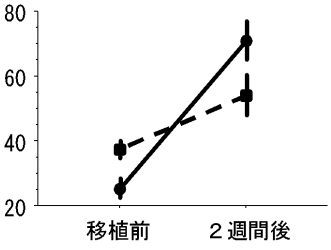
【図１６】



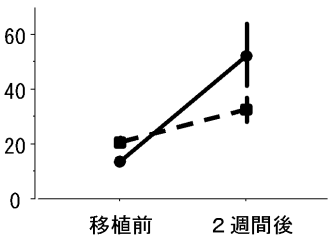
【図１７】



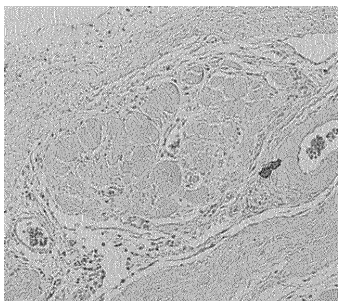
【図１８】



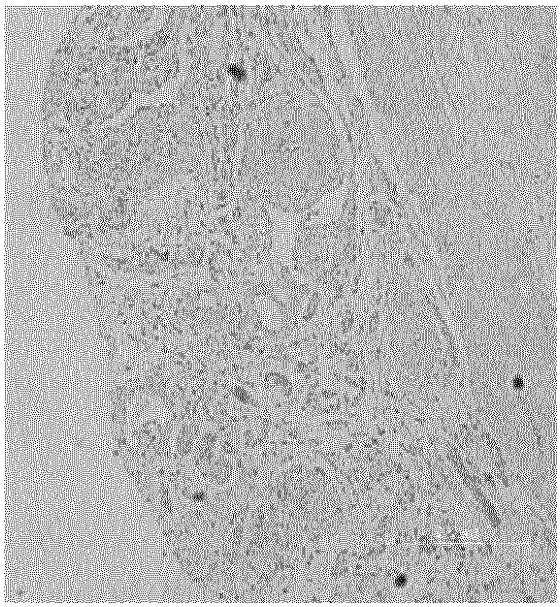
【図１９】



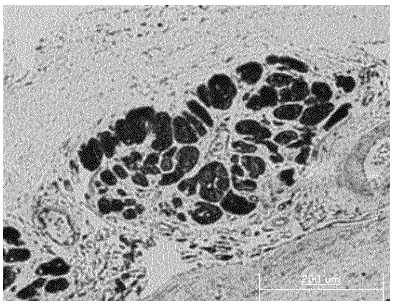
【図２０】



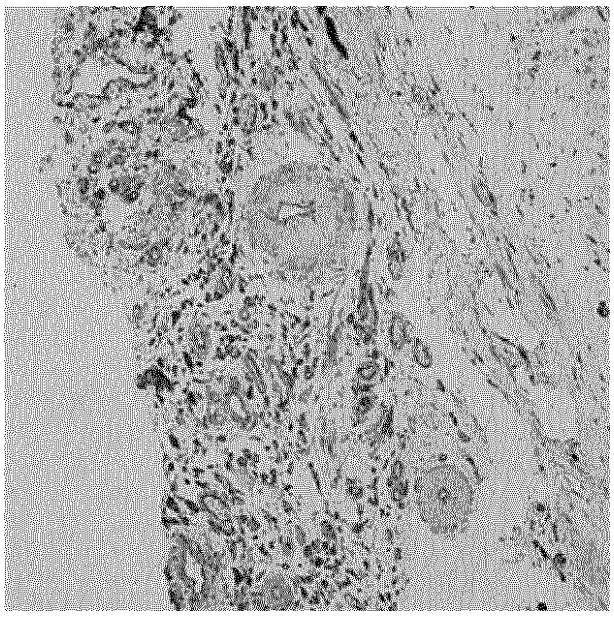
【図２１】



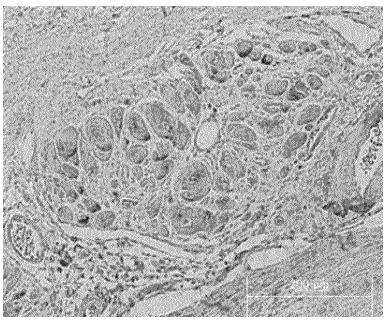
【図２２】



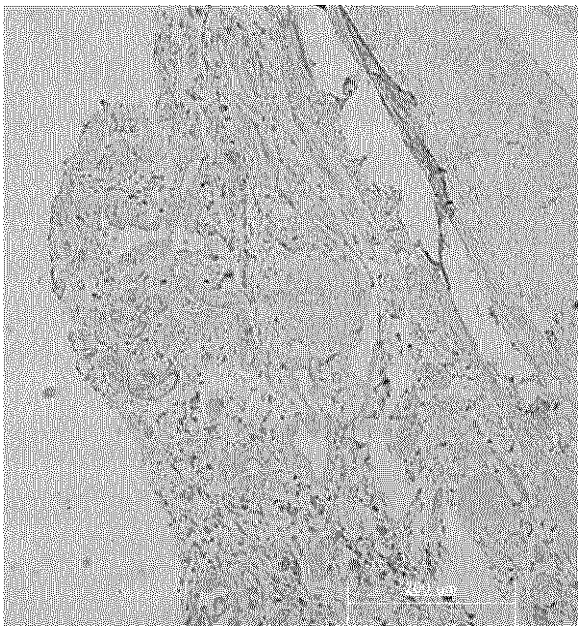
【図２３】



【図２４】

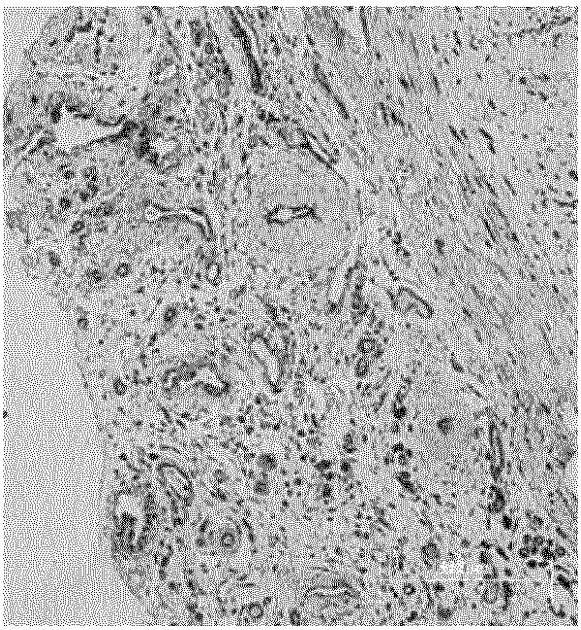


【図２５】

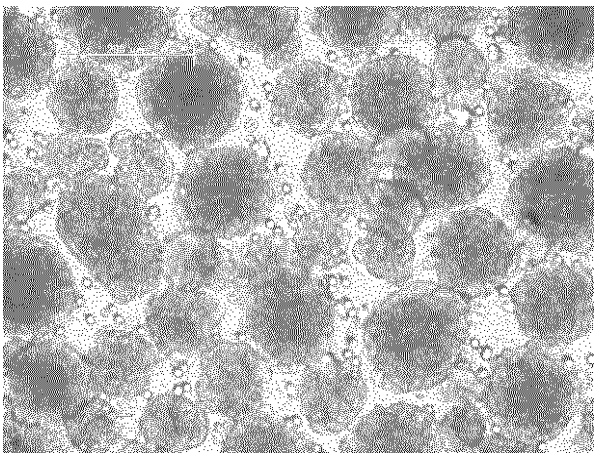


【図２６】

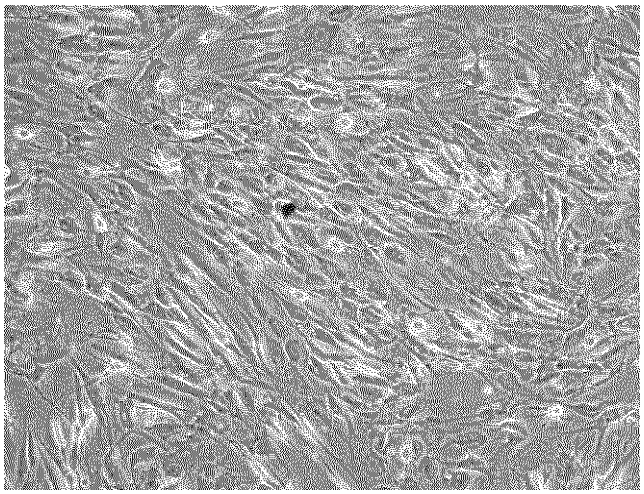
【図２７】



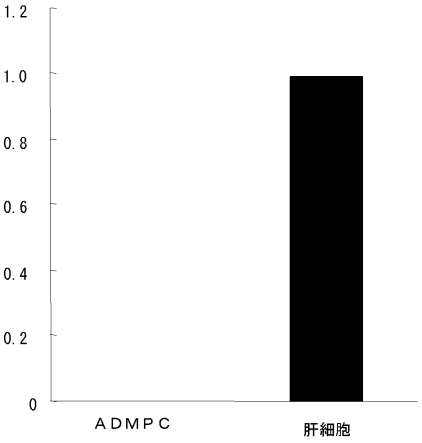
【図２８】



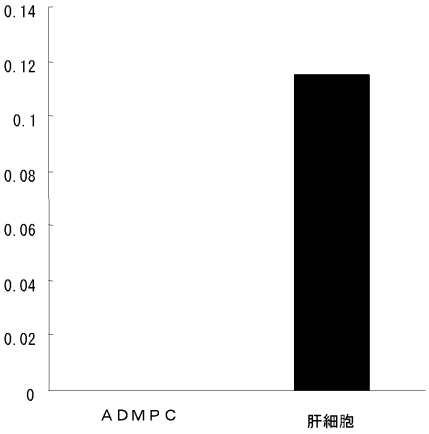
【図２９】



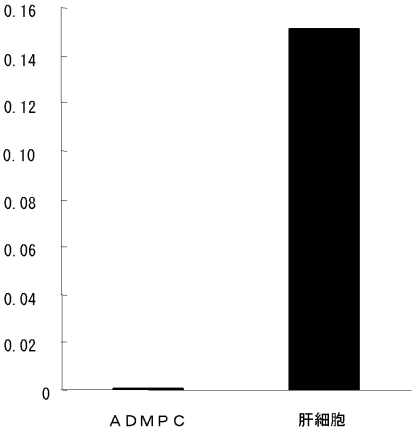
【図３０】



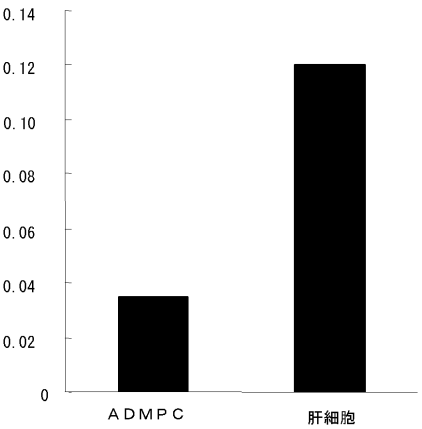
【図３１】



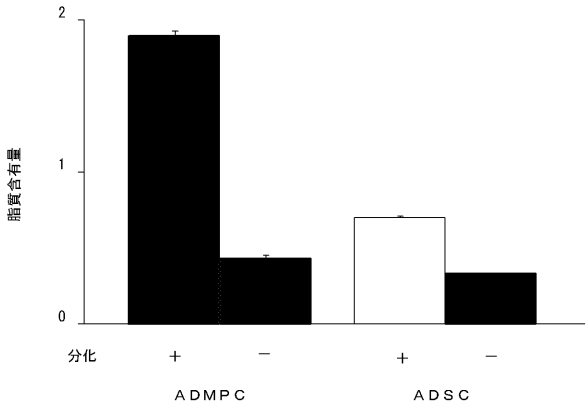
【図３２】



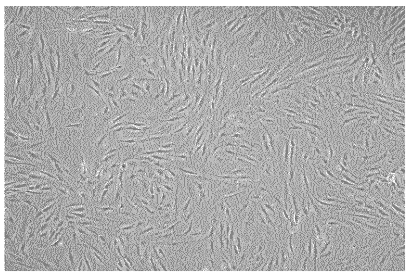
【図３３】



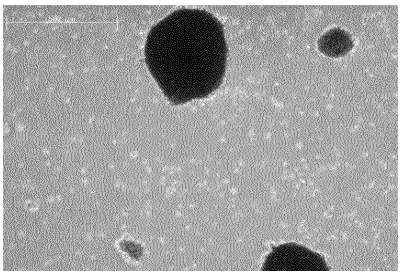
【図３４】



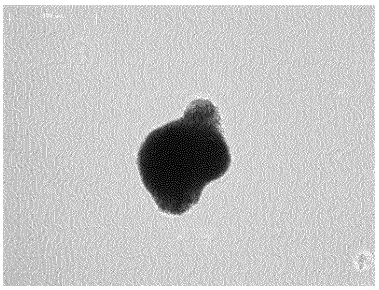
【図３５】



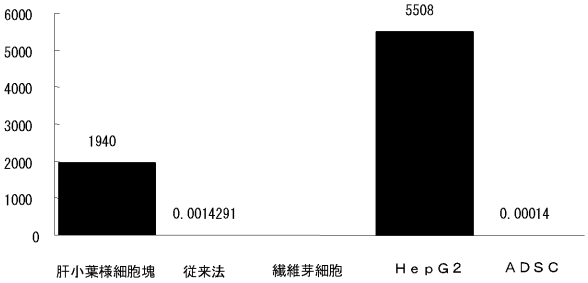
【図３６】



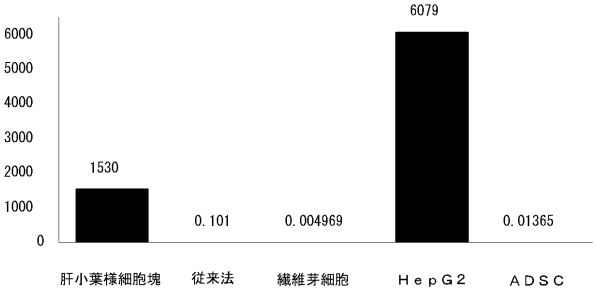
【図３７】



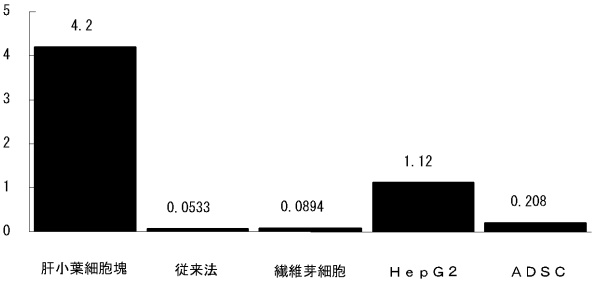
【図３８】



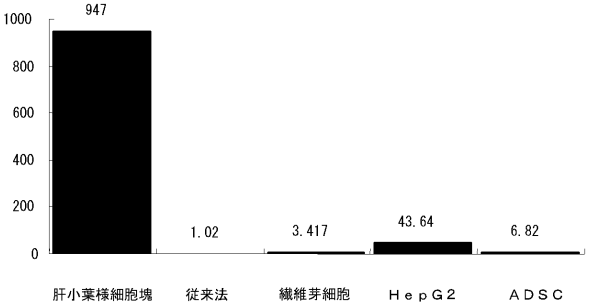
【図３９】



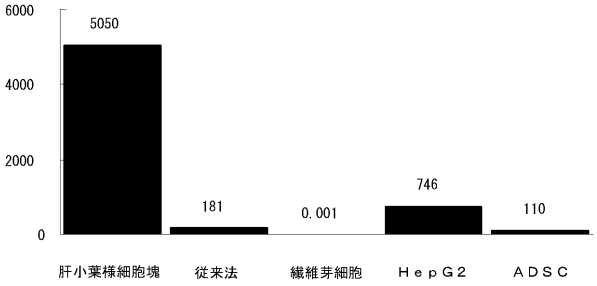
【図４０】



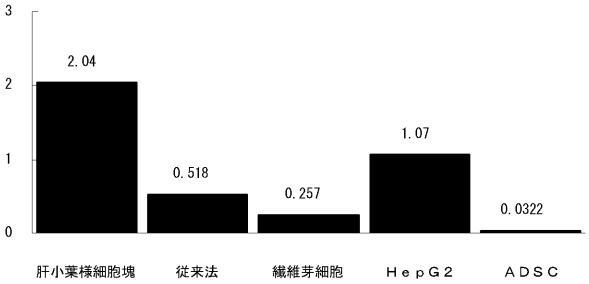
【図４１】



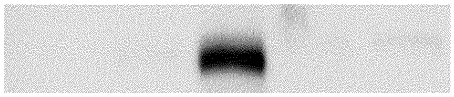
【図４２】



【図４３】

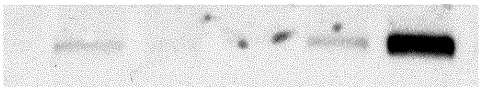


【図４４】



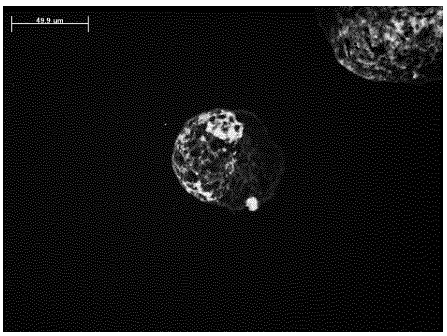
50 ng　500 ng　5000 ng　ＡＤＳＣ　肝小葉様細胞塊

【図４５】

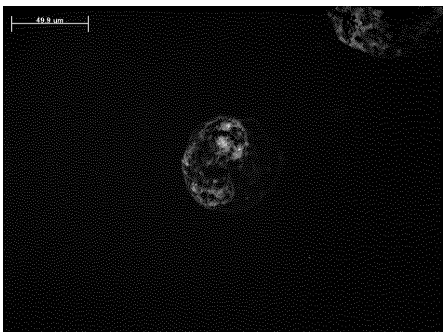


肝小葉様細胞塊　ＡＤＳＣ　0.005 ng　0.05 ng　0.5 ng

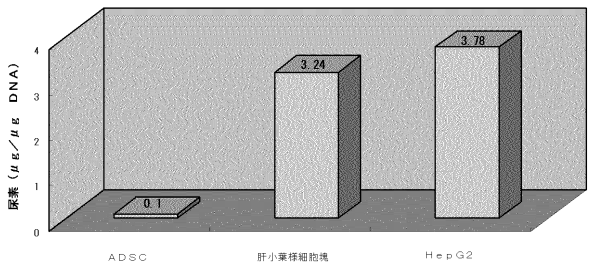
【図４６】



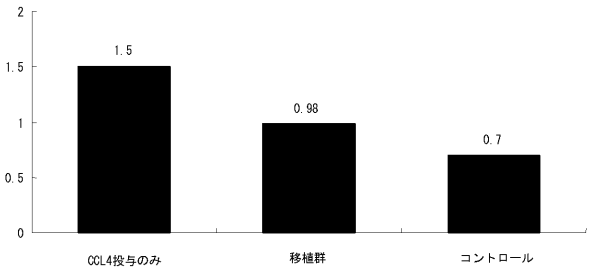
【図４７】



【図４８】



【図４９】



【配列表】
2008307205000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ａ	

(72)発明者 松山 晃文
大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内
(72)発明者 菰田 弘
大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内
(72)発明者 大倉 華雪
大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内

Ｆターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 CB26
4B024 AA01 AA11 CA05 DA02 HA12
4B063 QA18 QQ08 QQ61 QR69 QS40
4B065 AA90 AC12 BB11 BB40 CA44
4C081 AB17 BA12 CD34 DA02 EA11